

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

11.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

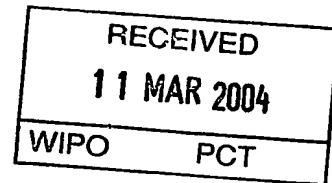
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 2 月 1 2 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 6 0 7 4 4

[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 6 0 7 4 4]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所
独立行政法人 科学技術振興機構

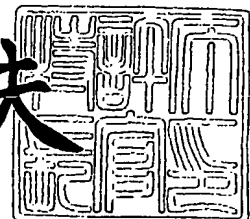


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 2 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 K018P03

【提出日】 平成14年12月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内

【氏名】 近江谷 克裕

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府守口市文園町10-15 関西医科大学医化学講座内

【氏名】 芦高 恵美子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府守口市文園町10-15 関西医科大学医化学講座内

【氏名】 伊藤 誠二

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代表者】 理事長 吉川 弘之

【連絡先】 0727-51-9681

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 12,600円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 6 0 / 1 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛋白質のプロセッシングを測定するためのモニター蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロセッシングを受けるアミノ酸残基又はアミノ酸残基配列を含むプロセッシング切断領域と、プロセッシングを受けることによりエネルギー移動特性変化を示す特性可変領域とを含む、蛋白質のプロセッシングを測定可能なモニター蛋白質。

【請求項 2】 特性可変領域が発光蛋白質と蛍光蛋白質を含む、請求項 1 に記載のモニター蛋白質。

【請求項 3】 プロセッシング切断領域が、特性可変領域を構成する発光蛋白質と蛍光蛋白質の間に位置する、請求項 1 または 2 に記載のモニター蛋白質。

【請求項 4】 特性可変領域の発光蛋白質が、分泌型ウミボタル (*Cypridina noctiluca*) 発光酵素であり、特性可変領域の蛍光蛋白質が、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来変異体の黄色蛍光タンパクとからなることを特徴とする、請求項 2 または 3 に記載のモニター蛋白質。

【請求項 5】 プロセッシング切断領域が S E Q K Q L Q K R F G G F T G G である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のモニター蛋白質。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のモニター蛋白質をコードする DNA 配列。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の DNA 配列を含む発現ベクター。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のモニター蛋白質、請求項 6 に記載の DNA 配列、および請求項 7 に記載の発現ベクターのいずれかをある特定の細胞に導入し、モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を定量的に評価することを特徴とする、該細胞のプロセッシング能を測定する方法。

【請求項 9】 被験蛋白質と請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のモニター蛋白質と反応させ、該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定する工程を含む、被験蛋白質のプロセッシング能を測定する方法。

【請求項 10】 プロセッシング酵素をスクリーニングする方法であって、被験蛋白質と請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させる工程；被

験蛋白質との反応の前後における該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程、を含む方法。

【請求項 11】 プロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、被験試料とプロセッシング酵素並びに請求項 1～5 のいずれかに記載のモニター蛋白質とを接触させる工程；被験試料の接触の前後での該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

【請求項 12】 プロセッシング（酵素活性）を促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、請求項 1～5 のいずれかに記載のモニター蛋白質、請求項 6 に記載の DNA 配列、および請求項 7 に記載の発現ベクターのいずれかが導入された細胞を調製する工程；被験試料の存在下及び非存在下で、該細胞で発現されたモニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性変化を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明に属する技術分野】

本発明は、プロセッシングによりタンパクが切断される領域と切断によってエネルギー移動特性が変化する特性可変領域を含むモニター蛋白質、それをコードする遺伝子、作成された本モニター蛋白質を用いるプロセッシング細胞や蛋白質、或いはプロセッシングを促進または抑制する化合物のスクリーニングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子の転写産物である蛋白質が直接機能を持つ事もあるが、多くの場合、翻訳後産物である蛋白質は糖付加、リン酸化、プロセッシング等の修飾過程を経て活性化される。そのうちプロセッシング過程ではプレプロ蛋白質から任意の場所が切断され活性ペプチドが切り出される。

【0003】

プレプロ蛋白質から活性ペプチドが切り出されるプロセッシング過程は、従来、切断後の活性ペプチドに対する特異的な抗体による検出や、電気泳動法やマスマスペクトル法による直接的な分子量の変化による検出を行ってきた。しかしながら、これらの方法は簡便な方法ではなく、直接的にプロセッシングを観察する手段ではない。

【0004】

発光酵素類は細胞内の遺伝子転写活性を直接観察する手段として有効であり、遺伝子発現検出モニター蛋白質として利用されている。また、蛍光タンパク質は細胞内で発現とほぼ同時期に、補因子を必要とせず、蛍光活性を持つ。細胞内で蛍光活性を指標として蛋白質の局在等に関するモニター蛋白質として利用されている。

【0005】

別個の蛋白質である蛍光蛋白質・蛍光蛋白質間、或いは発光酵素・蛍光蛋白質間のエネルギー移動を指標として分子間或いは分子内相互作用の変化を追跡する手法が開発され、蛍光蛋白質・蛍光蛋白質間のエネルギー移動を指標に細胞内のカルシウムイオンの変化や、発光酵素・蛍光蛋白質間エネルギー移動を指標に蛋白質のリン酸化を解析するモニター蛋白質が構築されている。しかしながら、これらエネルギー移動を指標としたプロセッシング過程を可視化、定量化するモニター蛋白質はない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、プロセッシング過程を可視化できるモニター蛋白質の作成及び最適化、さらに本モニター蛋白質を用いるプロセッシング酵素に対するスクリーニング法、プロセッシング酵素活性を抑制或いは促進する薬剤に対するスクリーニング法を開発し病態の治療、検査及び新薬開発に利用することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

エネルギー移動可能な発光酵素・蛍光蛋白質間にプロセッシング領域を挿入したモニター蛋白質構築物が作られれば、プロセッシングの前後でエネルギー移動

は変化し、それに伴い発光スペクトルは変化する。このスペクトル変化を指標に、プロセッシング後活性ペプチドの定量化、プロセッシング酵素活性の定量化及びプロセッシング場の局在解析、さらにはプロセッシング酵素活性を制御する遺伝子や蛋白質をスクリーニングでき、プロセッシングを指標とした各種病態の治療及び新薬開発（プロセッシングの促進または阻害作用を有する薬物の開発）への利用が可能となる。

【0008】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、プロセッシングによる切断を受けるプロセッシング切断領域と、プロセッシングを受けることにより発光蛍光エネルギー特性変化を示す特性可変領域を持つモニター蛋白質を作成した。

本発明は、以下のモニター蛋白質、それをコードする遺伝子、作成された本モニター蛋白質を用いるプロセッシング細胞や蛋白質、或いはプロセッシングを促進または抑制する化合物のスクリーニングする方法に関する。

項1. プロセッシングを受けるアミノ酸残基又はアミノ酸残基配列を含むプロセッシング切断領域と、プロセッシングを受けることによりを示す特性可変領域とを含む、蛋白質のプロセッシングを測定可能なモニター蛋白質。

項2. 特性可変領域が発光蛋白質と蛍光蛋白質を含む、項1に記載のモニター蛋白質。

項3. プロセッシング切断領域が、特性可変領域を構成する発光蛋白質と蛍光蛋白質の間に位置する、項1または2に記載のモニター蛋白質。

項4. 特性可変領域の発光蛋白質が、分泌型ウミボタル (*Cypridina noctiluc* a) 発光酵素であり、特性可変領域の蛍光蛋白質が、発光オワンクラゲ (*Aequore* a victoria) 由来変異体の黄色蛍光タンパクとからなることを特徴とする、項2または3に記載のモニター蛋白質。

項5. プロセッシング切断領域が S E Q K Q L Q K R F G G F T G G である、項1～4のいずれかに記載のモニター蛋白質。

項6. 項1～5のいずれかに記載のモニター蛋白質をコードするDNA配列。

項7. 項6に記載のDNA配列を含む発現ベクター。

項 8. 項 1～5 のいずれかに記載のモニター蛋白質、項 6 に記載の DNA 配列、および項 7 に記載の発現ベクターのいずれかをある特定の細胞に導入し、モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を定量的に評価することを特徴とする、該細胞のプロセッシング能を測定する方法。

項 9. 被験蛋白質と項 1～5 のいずれかに記載のモニター蛋白質と反応させ、該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定する工程を含む、被験蛋白質のプロセッシング能を測定する方法。

項 10. プロセッシング酵素をスクリーニングする方法であって、被験蛋白質と項 1～5 のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させる工程；被験蛋白質との反応の前後における該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程、を含む方法。

項 11. プロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、被験試料とプロセッシング酵素並びに項 1～5 のいずれかに記載のモニター蛋白質とを接触させる工程；被験試料の接触の前後での該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

項 12. プロセッシング（酵素活性）を促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、項 1～5 のいずれかに記載のモニター蛋白質、項 6 に記載の DNA 配列、および項 7 に記載の発現ベクターのいずれかが導入された細胞を調製する工程；被験試料の存在下及び非存在下で、該細胞で発現されたモニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性変化を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

【0009】

さらに、本願明細書は、以下の発明を開示する。

1. 以下の 1)～4) に示す蛋白質

- 1) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列によって表わされるタンパク質；
- 2) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、プロセッシングにより切断を受ける領域とそれに伴う特性可変領域（発光蛋白質と蛍光蛋白質）のいずれかの配列または位置が変更されたモニター蛋白質。

3) プロセッシング切断領域は配列番号 2 の下線部により図示されるが、これはプレプロノシスタチン蛋白質の切断点を含む 1 8 残基のアミノ酸配列である。プロセッシング切断配列は本配列に限定されるのではなく、好ましい具体例では、プロセッシング部位を含む前後 1 0 ~ 1 0 0, 好ましくは 2 0 - 4 0 残基であらわされる領域である。

4) 特性可変部位はプロセッシング切断領域の前／後において 3 次元立体構造が変化することを起因として特性が可変するものであれば良い。プロセッシング領域を挟んで発光蛋白質、蛍光蛋白質を配しプロセッシングの前後で発光蛋白質から蛍光蛋白質にエネルギー移動が成立しなくなり、発光色が変化するモニター蛋白質は好適である。

2. 以下 1) - 2) に示す遺伝子

1) 配列番号 1 記載に塩基配列により表わされる遺伝子。

2) 配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA がコードする遺伝子であって、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有するモニター蛋白質をコードする遺伝子。

【 0 0 1 0 】

好ましい実施形態において、モニター蛋白質は特性可変領域の両端にそれぞれ発光蛋白質、蛍光蛋白質を配した。モニター蛋白質において、いずれが N 末端側にあってもよいが、N 末端側から発光蛋白質 - 蛍光蛋白質の順序であるのがより好ましい。発光蛋白質と蛍光蛋白質を有するモニター蛋白質において、プロセッシングが起きない状況では、発光蛋白質 (分泌型ウミボタル (*Cypridina noctiluca*) 発光酵素) の発する青色光は蛍光蛋白質変異体 (E Y F P) にエネルギー移動しモニター蛋白質は黄緑色光を発するが、プロセッシングが起きた場合、エネルギー移動は成立せず、モニター蛋白質より青色光のみを発する。この特性可変領域における発光色変化を指標としてプロセッシングを解析できる。

従来、細胞内のリン酸化やカルシウムの動態を観察できるモニター蛋白質はあるが、プロセッシング過程を可視化、定量化できるモニター蛋白質は本発見者が初めて明らかにした。また、蛍光蛋白質・蛍光蛋白質間の、或いは発光蛋白質・

蛍光蛋白質間のエネルギー移動の変化を指標として細胞機能を解析するシステムも考案されているが、プロセッシングを解析するシステムへの利用は、本研究者が初めてである。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明のモニター蛋白質は、プロセッシング切断領域と、特性可変領域とを含む点に特徴を有する。

プロセッシング切断領域とは、プロセッシング酵素により切断を受ける2以上のアミノ酸を含む領域であり、モニター対象となるプロセッシング酵素の種類によりそのアミノ酸配列は変化する。

本発明において、プロセッシング切断領域とは、プロセッシング酵素により認識・切断可能なアミノ酸配列を含む領域であり、1以上のアミノ酸を含み、モニター対象となるプロセッシング酵素の種類によりそのアミノ酸配列は変化する。例えば配列番号2に示されるモニター蛋白質において、プロセッシング酵素であるPC1は切断点「KR」を認識して切断するが、配列番号2には4個の「KR」（ルシフェラーゼ部分に2個、プロセッシング切断領域に1個、YFPに1個）があるにもかかわらず、切断はプロセッシング切断領域のみで起こる。従って、プロセッシング切断領域は、切断点（KR）のみならず該切断点を酵素が認識し切断可能とするための補助的部分を有し、切断にほとんど或いは全く影響しない追加の配列をさらに含んでもよい。プロセッシング切断領域の一例としては、プロセッシング酵素（PC1）に対する「SEQKQLQKRFGGFTGG」が挙げられる。

【0012】

プロセッシング切断領域を、プロセッシング酵素としてPC1を例に取り説明する。

PC1の切断認識配列は、Lys-Argであり、プロセッシング切断領域はLys-Argを含み、さらにそのC末端側及びN末端側に3～50個、好ましくは4～40個、更に好ましくは5～20個のアミノ酸を連結してプロセッシング切断領域とすることができる。プロセッシング切断領域に用いられるアミノ酸は、Gly, Ala, Hi

s, Arg, Lys, Ser, Cys (シスチンを含む), Thr, Met, Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Gln, Asp, Proなどの蛋白質を構成する通常のアミノ酸が好ましいが、Sar、 β -アラニン、ノルバリン、オルニチン、システイン酸などの他の天然或いは合成のアミノ酸であってもよい。

上記は、プロセッシング酵素がPC1の場合であり、他のプロセッシング酵素に対するプロセッシング切断領域も同様にしてデザインすることができる。

切断領域の全アミノ酸数は、6～100個程度、好ましくは8～50個程度、更に好ましくは10～40個程度である。

プロセッシング酵素は、生体内で合成された蛋白質前駆体を限定分解し、成熟体蛋白質に変換する酵素であれば特に限定されず、例えばPC1, PC2, フリン, プロテアソーム、カテプシン、トロンビンが例示される。

【0013】

PC1以外のプロセッシング酵素と切断領域を以下に例示する。

【表1】

プロセッシング酵素	プロセッシング切断点のアミノ酸配列の例
PC1	KR↓
PC2	KR↓
フリン	RRKR↓
プロテアソーム	KM↓
カテプシン	KM↓
トロンビン	LVPR↓

例えば、PC1, PC2、フリンは、いずれもKRのC末端側蛋白質を切断するが、KRの前後の配列或いは全体としての蛋白質の構造を変化させることにより、特定のプロセッシング酵素により切断させることが可能になる。

【0014】

モニター対象となるプロセッシング酵素が1つの場合、1つの切断認識配列を含めばよいが、複数のプロセッシング酵素を同時にモニターする場合、2種以上のプロセッシング酵素に各々対応する、異なる切断認識配列を切断領域に導入することも可能である。また、特定のプロセッシング酵素の切断認識配列のみを有し、他のプロセッシング酵素の切断認識配列を有しない切断領域を構築することにより、特定のプロセッシング酵素活性のみを調節する化合物をスクリーニング

することができる。また、複数の基質に対して作用する1つのプロセッシング酵素を対象とした場合であっても、切断認識配列及びその前後の配列を例えば特定の基質の配列に合わせて適切に選択することにより、特定の基質のみのプロセッシングを促進または抑制する化合物をスクリーニングすることができる。

特性可変領域は、プロセッシング酵素により切断された場合に、そのエネルギー移動特性が変化するものであればよく、例えば発光蛋白質と蛍光蛋白質、発光蛋白質と着色蛋白質などの組み合わせを含むことができる。

【0015】

発光蛋白質と蛍光蛋白質をプロセッシング切断領域を介して連結した場合、プロセッシング切断領域が切断される前では発光蛋白質から蛍光蛋白質へのエネルギー移動が起きるが、切断後にはこのエネルギー移動が起きなくなり、切断の有無をエネルギー移動の測定により容易に定量できる利点がある。発光蛋白質と蛍光蛋白質並びにプロセッシング切断領域は、発光蛋白質－プロセッシング切断領域－蛍光蛋白質の順に連結するのが好ましいが、プロセッシング酵素による切断により発光蛍光特性が変化する限り、蛍光蛋白質－プロセッシング切断領域－発光蛋白質の順序で連結してもよい。

また、発光蛋白質の発光特性に重大な影響を有しない部位にプロセッシング切断領域を導入してもよい。この場合、発光蛋白質は、プロセッシング後に発光特性を失ってもよい。

同様に、蛍光蛋白質の蛍光特性に重大な影響を有しない部位にプロセッシング切断領域を導入してもよい。この場合、蛍光蛋白質は、プロセッシング後に蛍光特性を失ってもよい。

【0016】

発光蛋白質としては、ウミボタル、ヒオドシエビ、発光昆虫（ホタル、ヒカリコメツキなど）、発光ミミズ、ラチア、ウミシイタケ、オワンクラゲ（エクオリン）などの各種発光生物由来のルシフェラーゼが例示される。例えば、ウミボタル・ルシフェラーゼは分泌型であるので、これを用いるとモニター蛋白質が分泌型となり好ましい。ウミシイタケ由来のルシフェラーゼのように非分泌型ルシフェラーゼの場合には、N末端側に分泌タンパク質を導入し、分泌型発光蛋白質と

して利用することもできる。

蛍光蛋白質としては、グリーン蛍光蛋白質 (GFP)、黄色蛍光蛋白質 (YFP)、青色蛍光蛋白質 (BFP)、シアン蛍光蛋白質 (CFP)、DsRED、赤色蛍光蛋白質 (RFP) などが例示される。また、着色蛋白質として青色着色蛋白質 (フィコシアニン)、紅色着色蛋白質 (フィコエリトリン) が例示される。フィコシアニンとフィコエリトリンは、ホタルルシフェラーゼの光を吸収することができる。

本発明の蛍光蛋白質は、生物発光タンパク質から放出される光が蛍光蛋白質の励起波長になるように選択される。このような組み合わせとしては、例えば以下のものが挙げられる。

【0017】

【表2】

生物発光タンパク質	蛍光蛋白質または着色蛋白質
ウミボタル・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、
ホタル・ルシフェラーゼ	DsRED、フィコシアニン、フィコエリトリン
発光性渦鞭毛藻・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP
ヒカリコメツキ・ルシフェラーゼ	DsRED
ウミシイタケ・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP
エクオリン	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、

【0018】

好ましい1つの実施形態において、本発明のモニタータンパクは、以下の1)〜3)に示す蛋白質が例示される。

- 1) 配列番号2記載のアミノ酸配列によって表わされるモニタータンパク質。
- 2) 配列番号2記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列より表わされ、且つ発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有するモニター蛋白質。
- 3) 配列番号1記載の塩基配列により表わされるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパクであって、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有するモニター蛋白質。

【0019】

2) のタンパクは、1) のタンパクに発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を失わない程度の変異が導入されたタンパクである。このような変異は、自然界において生じるほかに、人為的な変異も含む。人為的な変異を生じさせる手段としては、部位特異的な変異誘導法 (Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982) などを挙げることができるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、分泌、発光、蛍光活性及びエネルギー移動特性が失われないう限り、その個数は制限されないが、通常は20アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、更に好ましくは10アミノ酸以内であり、最も好ましくは5アミノ酸以内である。変異を導入したタンパクが発光・蛍光活性を維持しているかは、そのタンパクの発光・蛍光活性を調べることによって判定できる。

【0020】

3) のタンパクは、DNA同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる分泌型発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有するモニター蛋白質である。3) のタンパクにおける「ストリンジントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1xSSC, 0.1%SDS, 37℃」程度であり、好ましくは「0.5xSSC, 0.1%SDS, 42℃」程度であり、更に好ましくは「0.2xSSC, 0.1%SDS, 65℃」程度である。ハイブリダイゼーションによって得られるDNAは配列番号1記載の塩基配列により表わされるDNAと通常高い相同性を有する。高い相同性とは、60%以上の相同性、好ましくは75%以上の相同性、更に好ましくは90%以上の相同性を指す。

【0021】

本発明のタンパクは、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。発現ベクターとして、例えば、pBT-VL-b-YFPなどを用いることができ、宿主細胞としては大腸菌BL21株などを用いることができる。

【0022】

本発明の遺伝子は、以下1) - 2) に示す遺伝子を包含する。

1) 配列番号1記載に塩基配列により表わされる遺伝子。

2) 配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA がコードする DNA 配列。

【0023】

上記の DNA がコードするタンパクは、DNA 同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる分泌型発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する蛋白質である。

本明細書において「ストリンジェントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1xSSC, 0.1%SDS, 37℃」程度であり、好ましくは「0.5xSSC, 0.1%SDS, 42℃」程度であり、更に好ましくは「0.2xSSC, 0.1%SDS, 65℃」程度である。ハイブリダイゼーションによって得られる DNA は配列番号 1 または 2 記載の塩基配列により表わされる DNA と通常高い相同性を有する。高い相同性とは、60%以上の相同性、好ましくは75%以上の相同性、更に好ましくは90%以上の相同性、特に95%以上の相同性を指す。

【0024】

本発明のタンパクは、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。発現ベクターとして、例えば、pBT-VL-mp-YFP (VLはウミボタル・ルシフェラーゼ、mpはモニターペプチド、YFPは黄色蛍光蛋白質をそれぞれ示す) などを用いることができ、宿主細胞としては哺乳動物細胞、酵母などの真核生物細胞、大腸菌、枯草菌、藻類、真菌類などの原核生物細胞が挙げられ、そのいずれを用いてもよい。好ましい宿主細胞としては、哺乳動物培養細胞COS7細胞株（この系では哺乳類系のタンパク合成、タンパク修飾過程を経ることが重要であり、つまり、この過程をモニタリングする）などを用いることができる。

【0025】

本発明の好ましいキメラタンパク質をコードする遺伝子（ポリヌクレオチド）は、

3) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する遺伝子。

4) 配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA とス

トリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有する遺伝子である。

【0026】

(スクリーニング方法 I)

本発明のモニター蛋白質、DNA配列又は発現ベクターのいずれかがある特定の細胞に導入し、モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を定量的に評価する。

該方法により、細胞のプロセッシング能を定量的に評価することが可能になる。

(スクリーニング方法 I I)

被験蛋白質と本発明のモニター蛋白質と反応させ、該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定することで、被験蛋白質のプロセッシング能を定量的に測定する。

該方法において、通常モニター蛋白質は複数用意し、被験蛋白質がどのモニター蛋白質のエネルギー移動特性を変化させるかを測定することにより、被験蛋白質がどのようなプロセッシング酵素であるのか、どのプロセッシング酵素の活性が強いのかなどを定量的に測定することができる。

(スクリーニング方法 I I I)

被験蛋白質と本発明のモニター蛋白質とを反応させる工程；被験蛋白質との反応の前後における該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程を行うことにより、新たなプロセッシング酵素をスクリーニングすることができる。

(スクリーニング方法 I V)

細胞フリーの系でプロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、被験試料とプロセッシング酵素並びに本発明のモニター蛋白質とを接触させる工程；被験試料の接触の前後での該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む。

該方法により、細胞内への移行性などの要因を考慮することなく、プロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングすることができる。

プロセッシング（酵素活性）を促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、本発明のモニター蛋白質、該モニター蛋白質をコードするDNA配列、および該DNA配列を含む発現ベクターのいずれかが導入された細胞を調製する工程；被験試料の存在下及び非存在下で、該細胞で発現されたモニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性変化を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む。

該方法により、経口投与等により血液中に移行させることにより薬効を発揮する化合物をスクリーニングすることができる。

次に、本発明を実施例を挙げてさらに詳細に説明する。

【0027】

【実施例】

実施例 1

ノシスタチンとノセプチンは同一のプレプロタンパク質よりプロセッシング過程で、切断酵素により切り出されるホルモンペプチドであり、生体内で痛みが伝わった場合、相反する効果を制御することが知られている。発光・蛍光タンパク質間でエネルギー移動可能な分泌型キメラタンパク質の挿入部位にプロセッシングされるノシスタチン（図中でNSTと標記）、ノセプチン（図中でNocと標記）ペプチド配列（図1(A)）を挿入したモニタータンパク質を、併せて、切断認識に必須、且つ切断されるLys - ArgをGly-Gly（図1(B)）に変異させたペプチド配列に、及び欠損させたペプチド配列（図1(C)）にしたモニタータンパク質を作成した。それぞれをVluc-NST/Noc-EYFP、mut-Vluc-NST/Noc-EYFP 及びdel-Vluc-NST/Noc-EYFPとした。作成法として、モニタータンパク質の挿入制限酵素部位であるBamHI部位を切断後、図2に示したDNA配列を化学合成したものをリガーゼ反応により結合させた。挿入されたことはDNA配列によって確認した。

実施例 2

神経細胞由来NG108-15に3つのモニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFP、mut-Vluc-NST/Noc-EYFP 及びdel-Vluc-NST/Noc-EYFPを含む遺伝子ベクターを、市販の導入試薬を用いて導入した。培養液中に分泌されたタンパク質をウエスタンブ

ロット法により解析した（図 3）。コントロールとして挿入配列を持たないVluc-EYFPを用いた。抗ウミボタルルシフェラーゼ抗体（anti-Vluc）はモニタータンパク質のN末端側の発光酵素を認識できる抗体であり、4つのモニタータンパク質ともに95 kDaの分子量である。また、抗緑色蛍光タンパク質抗体（anti-GFP）はモニタータンパク質のC末端側の蛍光タンパク質を認識できる抗体であり、4つのモニタータンパク質ともにメインタンパク質として95 kDaの分子量を示している。しかしながらVluc-NST/Noc-EYFPのモニタータンパク質では、95 kDaに比べてわずかではあるが27 kDaにバンドが確認できた。神経細胞由来NG108-15にはプロセッシング酵素が発現しており、このバンドはモニタータンパク質が切断を受け、切断された後のC末端側のEYFPを認識したものである。また、変異及び欠損を加えた2つのmut-Vluc-NST/Noc-EYFP、del-Vluc-NST/Noc-EYFPではこの27 kDaバンドは検出できず、プロセッシング酵素は挿入されたアミノ酸配列を厳密に認識できることが明らかとなった。但し、anti-GFP抗体で認識できる68 kDaのバンドは人為的なものと思われる。さらに、Vluc-NST/Noc-EYFPのモニタータンパク質で起きる切断が、インシュリンやエンケファリンなどを切断、産生する代表的なプロセッシング酵素であるPC1やPC2のどちらの作用によるのかを明らかにするため、PC1とPC2をモニタータンパク質に導入した細胞に強制発現させた。その結果、PC1では27 kDaバンドが95 kDaバンドに比べて著しく増加するが、PC2ではほとんど変化しないことが明らかとなった。この結果、ノシスタチン・ノセプチン（NST/Noc）間で起きるプロセッシングがPC1によることを世界で始めて明らかにした。

実施例 3

神経細胞由来NG108-15にモニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFP及びVlucを含む遺伝子ベクターを、市販の導入試薬を用いて導入した。併せてモニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPを発現する細胞にプロセッシング酵素PC1或いはPC2を強制発現させた。この4種類の細胞より分泌された培養液の発光スペクトルを測定した（図 4）。モニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPではVluc単独の発光スペクトルと一致する460nmの他にモニタータンパク質内で起きるエネルギー移動に

起因した525nmのピークが観測できる。このモニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPにプロセッシング酵素PC1或いはPC2を発現させた細胞の培養液ではPC2を加えた場合は変化しないが、PC1を発現させた場合、525nmのピークが減少する。これはウエスタンブロット法の結果から明らかなようにプロセッシング酵素PC1がモニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPを切断し、モニタータンパク質内のエネルギー移動が起きなくなったことを表わしている。つまり培養液の発光スペクトルを測定することで、生きた細胞内で起きているプロセッシングの程度を、細胞を破壊することなく評価できる。

実施例 4

神経細胞由来NG108-15に導入したモニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPの切断効率を、ウエスタンブロット法により検出し画像解析より非切断タンパク質量を定量化した（図5B）。また、モニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPとVlu単独の発光スペクトルを比較した差スペクトルを求め（図4のスペクトルの内図）、スペクトルの面積をエネルギー移動効果（BRETシグナル）として評価した（図5A）。モニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFP及びモニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPにPC2を導入した場合、非切断タンパク質量とBRETシグナル共に切断が起きていないことを、一方、モニタータンパク質Vluc-NST/Noc-EYFPにPC1を導入した場合、モニタータンパク質がおおよそ60%切断されていることを、非切断タンパク質量とBRETシグナル共に示している。これは、細胞内で起きているプロセッシングの効率を直接電気泳動のような方法で定量しなくても、培養液の発光スペクトルを測定することで、瞬時に評価できることが明らかとなった。

【0028】

【発明の効果】

本発明は、新規のプロセッシングを定量化できるモニター蛋白質及びそれをコードする遺伝子、本酵素の発現を制御する遺伝子を提供する。本モニタータンパク質を使用することで、細胞を破壊することなく細胞内で起きるプロセッシング過程を可視化できる。これらは病態の治療、検査及び新薬開発に利用が可能である。

【 0 0 2 9 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Monitor protein for measuring protein processing

<130> K18P03

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211>

<212> DNA

<213>

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 1

atgaagataa taattctgtc tggttatattg gcctactgtg tcaccgacaa ctgtcaagat 60

gcatgtcctg tagaagcgga accgccatca agtacaccaa cagttccaac ttcttgtgaa 120

gctaaagaag gagaatgtat agataccaga tgcgcaacat gtaaacgaga tatactatca 180

gatggactgt gtgaaaataa accagggaag acatgctgta gaatgtgcca gtatgtgatt 240

gaatgcagag tagaagcagc tgggtatattt agaacgtttt acggcaaaag atttaatttt 300

caggaacctg gtaaatatgt gctggctagg ggaaccaagg gtggcgattg gtctgttaacc 360

ctcaccatgg agaatctaga tggacagaag ggagctgtgc tgactaagac aacactggag 420

gttgcaggag acgtaataga cattactcaa gctactgcag atcctatcac agttaacgga 480

ggagctgacc cagttatcgc taacccgttc acaattgggtg aggtgaccat tgctgttggt 540

gaaataccgg gcttcaatat cacagtcac gaattcttta aactaatcgt gattgatatt 600

ctgggaggaa gatctgtgag aattgctcca gacacagcaa acaaaggact gatatctggt 660

atctgtggta atctggagat gaatgacgct gatgacttta ctacagatgc agatcagctg 720

gcgatccaac ccaacataaa caaagagttc gacggctgcc cattctatgg caatccttct 780

gatatcgaat actgcaaagg tctgatggag ccatacagag ctgtatgtcg taacaatatc 840

aacttctact attacactct atcctgtgcc ttcgcttact gtatgggagg agaagaaaga 900

gctaaacacg tccttttcga ctatgttgag acatgcgctg cgccggaaac gagaggaacg 960

tgtgttttat caggacatac tttctatgac acattcgaca aagcaagata tcaattccag 1020

ggcccatgca aggagattct gatggccgca gactgttact ggaacacatg ggatgtaaag 1080

gtttcacata gagacgtcga atcatacact gaggtagaga aagtaacaat caggaaacag 1140

tcaactgtag tagatctcat tgtggatggc aagcaggtca aggttggagg agtggatgta 1200

tctatcccgt acagctctga gaacacttcc atatactggc aggatggaga catcctgacg 1260

acggccatcc tacctgaagc tcttgtcggt aagtccaact ttaagcagct ccttgtagtt 1320

catatcagag atccattcga tggaaagaca tgcggcatat gtggttaacta taatcaagat 1380

tcaactgatg atttctttga cgcagaagga gcatgcgctc taacccccaa cccccagga 1440

tgtacagagg aacagaaacc agaagctgag cgactttgca ataatctctt tgattcttct 1500

atcgacgaga aatgtaatgt ctgctacaag cctgaccgga ttgcccgatg tatgtacgag 1560

tattgcctga ggggacaaca aggattttgt gaccatgctt gggagttaa gaaagaatgc 1620

tacataaac atggagacac tctagaagta ccacctgaat gtcaaggatc cacagagccc 1680

ggcctggagg aggtggggga gattgagcag aaacagctgc agaagcgggt cgggggcttc 1740

accggggccc ggaagtcggc ccggaagttg gcccaaccagg gatccgtgag caagggcgag 1800

gagctgttca ccggggtggt gcccacctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac 1860

aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag 1920

ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca cctcgtgac caccttcggc 1980

tacggcctgc agtgcttcgc ccgtacccc gaccacatga agcagcacga ctctttcaag 2040

tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcacatct tcttcaagga cgacggcaac 2100

tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc tggatgaaccg catcgagctg 2160

aagggcacatg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac 2220

aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc 2280

aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac 2340

accccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc 2400

gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc 2460

gccgccggga tcactctcgg catggacgag ctgtacaagt aa 2502

<210> 2

<211> 833

<212> PRT

<213> mammalian

<400> 2

Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp

1

5

10

15

Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr

20

25

30

Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp

35

40

45

Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys

50

55

60

Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile

65

70

75

80

Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys

85

90

95

Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr

100

105

110

Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly

115

120

125

Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp

130

135

140

Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly
145 150 155 160

Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr
165 170 175

Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe
180 185 190

Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile
195 200 205

Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn
210 215 220

Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu
225 230 235 240

Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr
245 250 255

Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr
260 265 270

Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser
275 280 285

Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val
290 295 300

Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr
305 310 315 320

Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg
325 330 335

Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys
340 345 350

Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser
355 360 365

Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val

370

375

380

Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val

385

390

395

400

Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly

405

410

415

Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe

420

425

430

Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly

435

440

445

Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp

450

455

460

Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly

465

470

475

480

Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu

485

490

495

Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp
500 505 510

Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly
515 520 525

Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His
530 535 540

Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Thr Glu Pro
545 550 555 560

Gly Leu Glu Glu Val Gly Glu Ile Glu Gln Lys Gln Leu Gln Lys Arg
565 570 575

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Leu Ala Asn
580 585 590

Gln Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro
595 600 605

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val
610 615 620

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
625 630 635 640

Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
645 650 655

Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His
660 665 670

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
675 680 685

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
690 695 700

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
705 710 715 720

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
725 730 735

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln
740 745 750

Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
755 760 765

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
770 775 780

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser
785 790 795 800

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
805 810 815

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
820 825 830

Lys

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> mammalian

<400> 3

Ser Glu Gln Lys Gln Leu Gln Lys Arg Phe Gly Gly Phe Thr Gly Gly

1

5

10

15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> mammalian

<400> 4

Ser Glu Gln Lys Gln Leu Gln Gly Gly Phe Gly Gly Phe Thr Gly Gly

1

5

10

15

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> mammalian

<400> 5

Ser Glu Gln Lys Gln Leu Gln Phe Gly Gly Phe Thr Gly Gly
1 . 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】エネルギー移動可能な分泌型キメラタンパク質にプロセッシング部位（A）、及びその部位を変異（B）或いは欠損（C）させた領域を挿入した構築物を示す。

【図2】エネルギー移動可能な分泌型キメラタンパク質にプロセッシング部位（A）、及びその部位を変異（B）或いは欠損（C）させた領域のDNA配列を示す。

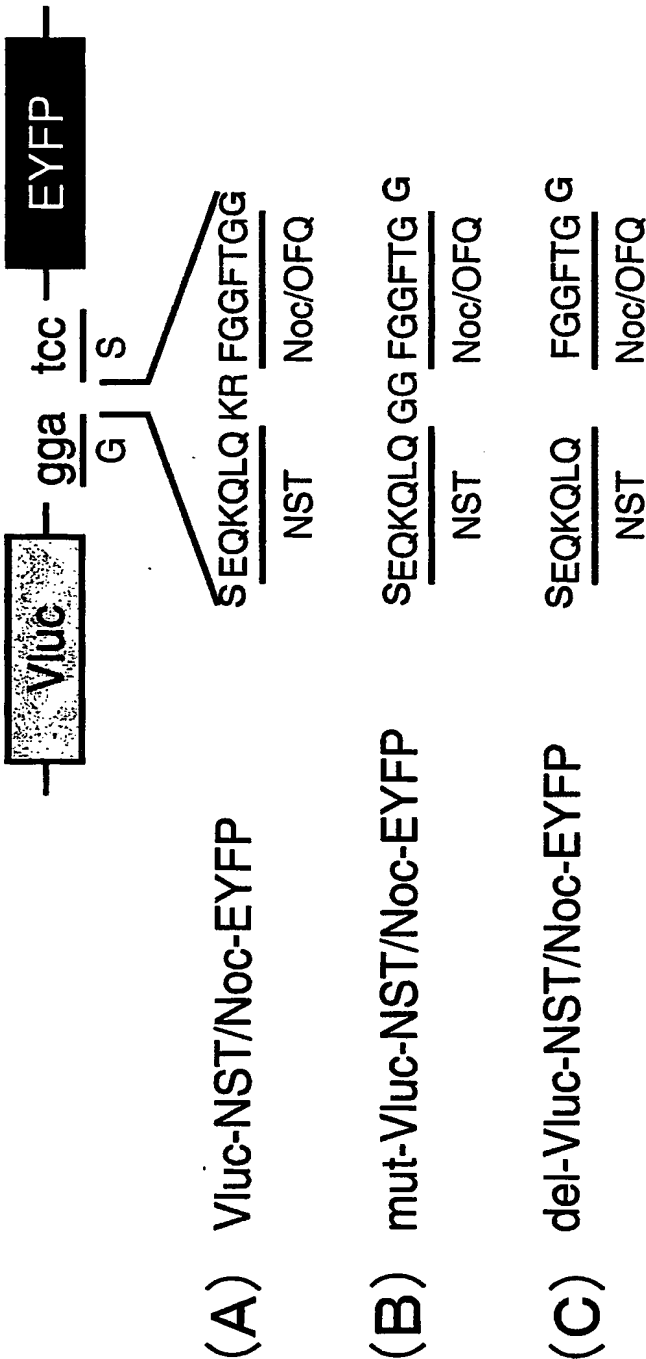
【図3】 プロセッシング配列を挿入した分泌型キメラタンパク質を導入した細胞内、及び細胞外でのウエスタンブロット解析及びプロセッシング酵素を導入した場合の切断効率の変化の検出結果を示す。

【図4】 プロセッシング配列を挿入した分泌型キメラタンパク質を発現する細胞にプロセッシング酵素を導入した場合、エネルギー移動効率、スペクトルが変化するを示す。(a) Vluc-NST/Nco-EYFP単独、(b) Vluc-NST/Nco-EYFPにPC1を発現、(c) Vluc-NST/Nco-EYFPにPC2を発現。

【図5】 プロセッシング配列を挿入した分泌型キメラタンパク質のエネルギー移動効率は切断酵素PC1により大きく減少し、同様に切断効率をウェスタンブロットの結果より定量化した結果を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



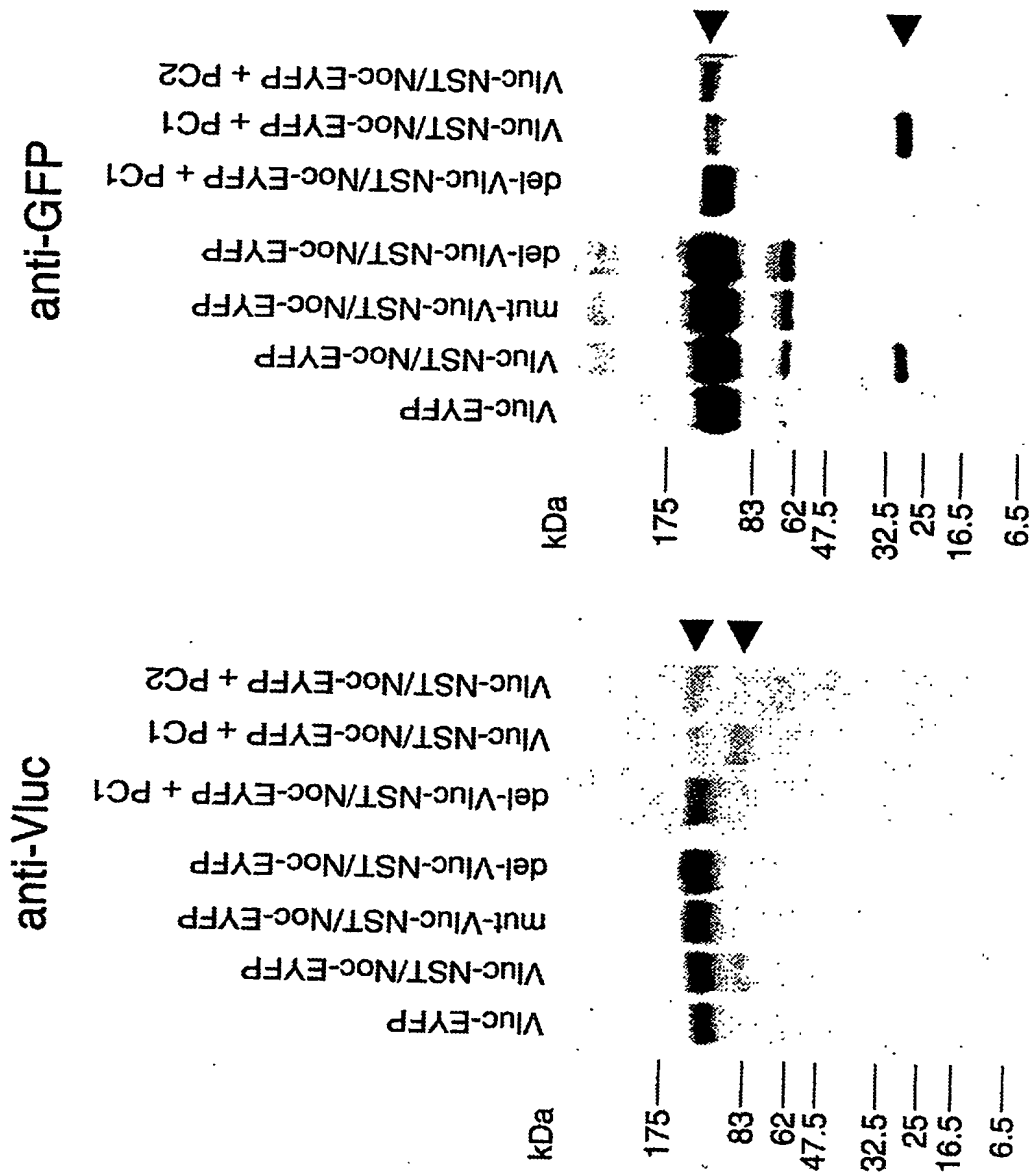
【図 2】

(A) GATCCGAGCAGAAACAGCTGCAGAACGGTTCGGGGGCTTCACCCGGG
GCTCGTCTTTGTCGACGTCTTCGCCAAGCCCCCGAAGTGGCCCGATC
GlySerGluGlnLysGlnLeuGlnLysArgPheGlyGlyPheThrGlyGlySer

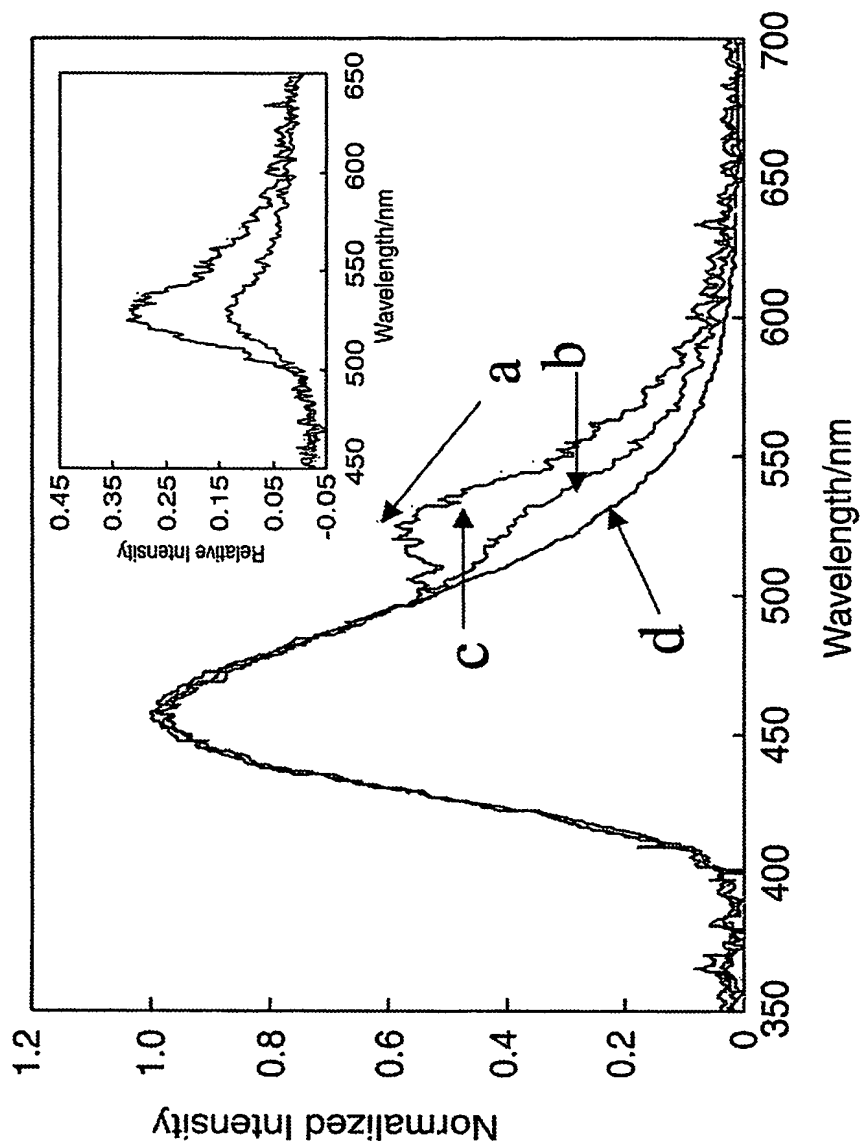
(B) GATCCGAGCAGAAACAGCTGCAGGGGGGCTTCGGGGGCTTCACCCGGG
GCTCGTCTTTGTCGACGTCCCCCCCCAAGCCCCCGAAGTGGCCCGATC
GlySerGluGlnLysGlnLeuGlnGlyGlyPheGlyGlyPheThrGlyGlySer

(C) GATCCGAGCAGAAACAGCTGCAGTTCGGGGGCTTCACCCGGG
GCTCGTCTTTGTCGACGTCAAGCCCCCGAAGTGGCCCGATC
GlySerGluGlnLysGlnLeuGlnPheGlyGlyPheThrGlyGlySer

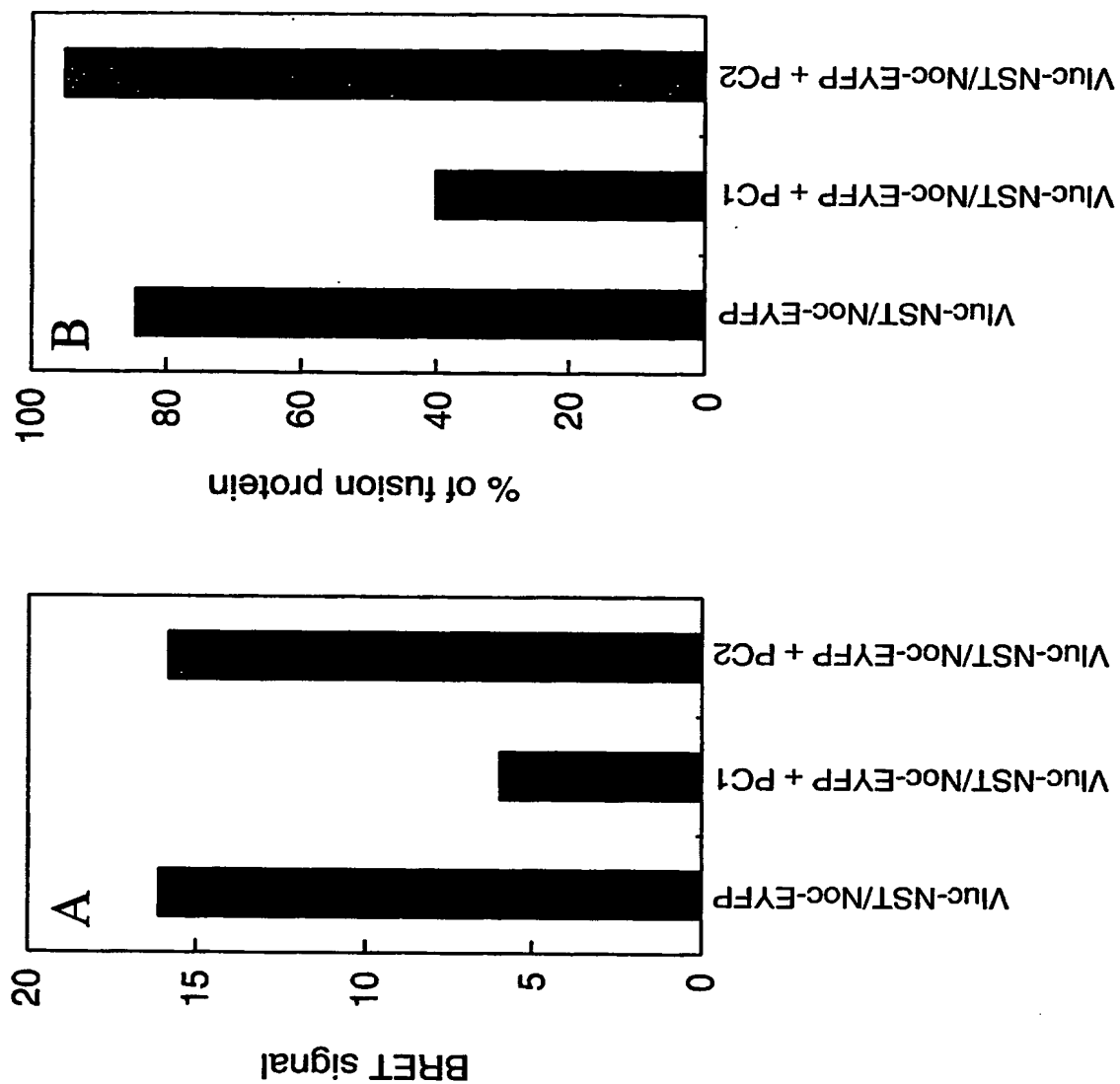
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 プロセッシング過程を簡便にモニターすることができるプロセッシングモニター蛋白質を作成する。

【解決手段】 プロセッシングを受けるアミノ酸残基又はアミノ酸残基配列を含むプロセッシング領域と、プロセッシングを受けることにより生じる少なくともプロセッシング領域を含む蛋白質の立体構造に起因し発光蛍光エネルギー特性変化を示す分泌型キメラタンパク質とを含む、蛋白質のプロセッシングを測定するモニター蛋白質。

【選択図】

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-360744
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417
【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 2 - 3 6 0 7 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 4 月 2 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 2 - 3 6 0 7 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	科学技術振興事業団

特願 2 0 0 2 - 3 6 0 7 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構